

学位論文題名

ラット肝細胞膜特異抗体による肝障害に関する実験的研究

学位論文内容の要旨

ウイルス肝炎を含めた種々の肝障害において、その発生および進展に免疫反応の関与が指摘されている。特に、肝細胞膜上に存在する臓器特異抗原と、これに対する抗体を介した免疫反応が、肝細胞障害の発生と進展に深く関わる事が示唆されている。しかし、多くの精力的な研究にもかかわらず、肝障害の発現に対する肝特異抗原の果たす役割については不明な点が多い。本論文では、肝障害の発生に対する免疫学的機序の関与を探るために、ラットの肝細胞膜抗原に対する単クローン抗体を用いての実験的研究を行い、以下の成績を得た。

ラット肝細胞膜に存在する分子量 105,000の糖蛋白質抗原（RLSA）を認識する、ハイブリドーマ RM-1株由来の IgM型モノクローナル抗体（MoAb）を用い、RLSAの種および臓器特異性ならびに個体発生過程における発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、ラットでは本抗原は肝細胞膜にのみ認められ、他の臓器、組織には検出されなかつた。この抗原は肝細胞表面を構成する類洞、細胞間および毛細胆管側面の膜に均等に存在し、細胞質内には検出されなかつた。また、分離肝細胞の超微形態学的観察により、RLSAは微絨毛を含む細胞膜表面に存在することが確認された。RLSAはマウス、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ウシ、ニワトリ、サルおよびヒトの肝組織には存在

しなかった。以上の所見から，MoAbにより認識される抗原は，ラット肝細胞膜にのみ存在する，臓器および種特異的な抗原であるとみなされた。

ラットの発生および成熟過程における RLSAの発現を検討した結果，この抗原は妊娠 18日齢以前の胎子肝には検出されず，妊娠 19日齢からの幼若肝細胞の接合部の膜に発現していた。この抗原量は生後急速に増加し，生後 25日では肝細胞膜全周に認められるようになり，以後検索した 22週齢まで変化なく観察された。RLSAは，成熟ラットにおいては，肝小葉の門脈周囲，中間帯，中心静脈周囲に存在する肝細胞膜の全周に均等に観察され，肝小葉内における抗原の局在は認められなかった。

RLSAを認識する MoAbを用い，ラットの初代培養肝細胞に急性壊死性変化を誘導した。すなわち，補体源としてのラット新鮮血清の存在下で肝細胞培養液に MoAbを添加した結果，MoAbの濃度に依存して肝細胞逸脱酵素 lactate dehydrogenaseが急激に上昇した。この細胞障害は，補体非存在下では発生しなかったことから，抗原抗体反応により活性化された補体によって誘導されたものと考えられた。

形態学的には，MoAb添加後速やかに細胞表面に多数のブレブが形成され，細胞内小器官の変性が細胞表面から細胞中心部へと進行していた。ブレブ内には細胞内小器官はほとんど認められず，これは種々の薬剤性肝障害で形成されるブレブの形態とは異なっていた。本障害は補体の膜への直接的侵襲によるものであり，間接的に膜障害が惹起される薬剤性障害とは成因的に異なるようであった。一方，肝細胞膜の形態的变化に先行して細胞膜直下に変性した細胞骨格とみなされる線維様構造が認められた。したがって，補体による膜侵襲の過程では，細胞内に

流入した Ca^{2+} により細胞骨格系に破綻が生じ、これが細胞膜断裂を伴った変化の一因をなすものと考えられた。

MoAbをラットの尾静脈に投与することにより、肝臓に一過性の劇症型肝炎が誘発された。すなわち MoAb投与直後から、肝小葉中間帯および門脈域に、充出血を伴った肝細胞の融解壊死巣が多数形成された。この壊死巣には炎症性細胞浸潤は認められなかったが、MoAbと補体第3成分 C3の沈着を認めた。血清中の MoAbは投与直後から急速に低下し、投与後 30分以降では検出されなかった。血清中補体価は MoAb投与直後から急速に低下し、投与後 10分で最低値に達したが、以後漸次上昇し投与後 4時間には正常値の 50%まで回復した。一方、コブラ毒ファクターによって補体系を枯渇させたラットにおいては、MoAb投与による肝障害の発生は認められなかった。

MoAb投与後 1時間から、12時間まで、壊死巣は次第に拡大したが、この時期の肝細胞の壊死は凝固壊死であり、壊死巣には C3の沈着はなかった。また血清中からは MoAbが消失し、補体価は回復傾向を示した。以上から、MoAb投与 1時間以降に生じる肝細胞の凝固壊死は、融解壊死による局所的な微小循環障害の結果生じるものと考えられた。

一方、血清中の肝細胞逸脱酵素 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) は MoAb投与後急速に上昇し、投与 12時間後には最高値に達した。しかし AST, ALTは MoAb投与 3日後には正常値に復した。病理組織学的には MoAb投与後 12時間以降では肝細胞の壊死性変化は終息に向かい、肉芽組織による置換を経て瘢痕化した。なお MoAb投与後 3週目では、肝臓組織像は正常であった。以上の成績から、MoAbによるラットの肝細胞の壊死は、抗原抗体反応により誘発

された補体の活性化により引き起こされるものと考えられた。

以上，RLSAを認識する MoAbと肝細胞膜との抗原抗体反応に基づく，補体依存性細胞融解（complement-dependent cytotoxicity: CDC）により，急性の壊死性肝細胞障害が惹起されることを示した。これまでに多くの肝細胞膜特異抗原を認識する抗体が報告されているが，これらの抗体による肝細胞障害性は示されていない。本研究において確立した肝細胞障害の実験系は，肝細胞膜特異抗原と液性免疫因子との関与によって生じると推測されている肝障害，例えば劇症型肝炎の発症機序の解明に極めて有用なモデルになるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 板 倉 智 敏
副 査 教 授 杉 村 誠
副 査 教 授 佐 藤 文 昭
副 査 教 授 齊 藤 昌 之

学位論文題名

ラット肝細胞膜特異抗体による肝障害に関する実験的研究

本研究では、ラットの肝細胞膜に存在する分子量105,000の糖蛋白質抗原(RL S A)を認識するIgM型モノクローナル抗体(M o A b)を用い、抗原抗体反応によって肝障害の起こることを明らかにした。

RL S Aはラットの肝細胞膜にのみ認められ、この細胞質、肝臓以外の細胞・組織、他の動物並びにヒトのあらゆる細胞には認められない特異的な抗原であった。この抗原は、胎齢19日から出現し始め、生後25日以降では肝細胞膜全周に及んで存在した。

ラットの初代培養肝細胞の培養液に、M o A bと、補体源としてラット新鮮血清を添加した結果、肝細胞に壊死性変化が生じた。しかし、この培養液に補体源を添加しない場合には、肝細胞壊死は誘導されなかった。

M o A bをラットの尾静脈内に投与した結果、肝臓に多発性壊死巣が一過性に誘発された。すなわち、壊死巣はM o A b投与後直ちに起こり、12時間まで拡大し、以後修復に向かった。M o A b投与後早期の壊死巣には、M o A bと補体成分C₃の沈着を認めたが、1時間後の壊死巣にはC₃の沈着はなかった。

血清中のM o A bは、投与後10分で最低値に達し、以後漸次上昇し、投与後4時間で正常値の50%まで回復した。一方、コブラ毒ファクターによって補体

系を枯渇させたラットにおいては、M o A b 投与による肝細胞壊死は誘発されなかった。また、血清中の肝細胞逸脱酵素aspartate aminotransferaseとalanine aminotransferaseは、M o A b 投与後急速に上昇し、12 時間後には最高値に達した。しかし、投与 3日後には両酵素は正常値に復した。

以上のように、申請者は、R L S A を認識する M o A b と肝細胞膜との抗原抗体反応に基づき、補体依存性の肝細胞融解、すなわち壊死の起こることを実証した。この成果は、肝障害の発症機序の解明に大きく貢献する。よって審査員一同は、池田 卓也氏が、博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。